Université de Bordeaux
Collège des Sciences de la Santé
UFR des Sciences Odontologiques

Année 2015 N°74

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

Présentée et soutenue publiquement

Par Pauline POIRIER

Née le 7 septembre 1988 à Marseille

Le Vendredi 20 Novembre 2015

Recherche de *Scardovia Wiggsiae* dans la Carie Précoce de l'Enfance : étude expérimentale.

Directeur de Thèse

Dr Cécile BADET

Membres du Jury

Président	Mme V.DUPUIS	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Directeur	Mme C.BADET	Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier
Rapporteur	Mme J.NANCY	Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier
Assesseur	Mme D.N-GUYEN	Assistante Hospitalo-Universitaire

UNIVERSITE DE BORDEAUX

Président	M.	Manuel TUNON de LARA
Directeur de Collège des Sciences de la Santé	M.	Jean-Luc PELLEGRIN

COLLEGE DES SCIENCES DE LA SANTE
UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE DES SCIENCES ODONTOLOGIQUES

Directrice	Mme	Caroline BERTRAND	58-02
Directrice Adjointe – Chargée de la Formation initiale	Mme	Dominque ORIEZ	58-01
Directeur Adjoint – Chargé de la Recherche	M.	Jean-Christophe FRICAIN	57-02
Directeur Adjoint – Chargé des Relations Internationales	M.	Jean-François LASSERRE	58-02

ENSEIGNANTS DE L'UFR

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme	Caroline	BERTRAND	Prothèse dentaire	58-02
Mme	Marie-José	BOILEAU	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme	Véronique	DUPUIS	Prothèse dentaire	58-02
M.	Jean-Christophe	FRICAIN	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme	Elise	ARRIVÉ	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
Mme	Cécile	BADET	Sciences biologiques	57-03
M.	Etienne	BARDINET	Orthopédie dento-faciale	56-02
M.	Michel	BARTALA	Prothèse dentaire	58-02
M.	Cédric	BAZERT	Orthopédie dento-faciale	56-02
M.	Jean-Pierre	BLANCHARD	Prothèse dentaire	58-02
M.	Christophe	BOU	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
Mme	Sylvie	BRUNET	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
M.	Sylvain	CATROS	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
M.	Stéphane	CHAPENOIRE	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
M.	Jacques	COLAT PARROS	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
M.	Reynald	DA COSTA NOBLE	Parodontologie	57-01
M.	François	DARQUE	Orthopédie dento-faciale	56-02
M.	François	DE BRONDEAU	Orthopédie dento-faciale	56-02
M.	Yves	DELBOS	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Raphael	DEVILLARD	Odontologie conservatrice- Endodontie	58-01
M.	Emmanuel	D'INCAU	Prothèse dentaire	58-02
M.	Bruno	ELLA NGUEMA	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
M.	Dominique	GILLET	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Jean-François	LASSERRE	Prothèse dentaire	58-02
M.	Yves	LAUVERJAT	Parodontologie	57-01
Mme	Odile	LAVIOLE	Prothèse dentaire	58-02
M.	Jean-Marie	MARTEAU	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
Mme	Javotte	NANCY	Odontologie pédiatrique	56-01

Mme	Dominique	ORIEZ	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Jean-François	PELI	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Philippe	POISSON	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
M.	Patrick	ROUAS	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Johan	SAMOT	Sciences biologiques	57-03
Mme	Maud	SAMPEUR	Orthopédie dento-faciale	56-02
M.	Cyril	SEDARAT	Parodontologie	57-01
Mme	Noélie	THEBAUD	Sciences biologiques	57-03
M.	Eric	VACHEY	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01

ASSISTANTS

Mme	Audrey	AUSSEL	Sciences biologiques	57-03
M.	Terence	BARSBY	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Mme	Aurélie	BARSBY-EL-KHODER	Prothèse dentaire	58-02
M.	Julien	BROTHIER	Prothèse dentaire	58-02
M.	Mathieu	CLINKEMAILLIE	Prothèse dentaire	58-02
M.	Mathieu	CONTREPOIS	Prothèse dentaire	58-02
M.	Guillaume	CRESTE	Prothèse dentaire	58-02
Mme	Clarisse	DE OLIVEIRA	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme	Hélène	DENOST	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
M.	Guillaume	FENOUL	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Mme	Elsa	GAROT	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Nicolas	GLOCK	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
Mme	Sandrine	GROS	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme	Olivia	KEROUREDAN	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-02
Mme	Alice	LE NIR	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
Mme	Karine	LEVET	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
M.	Alexandre	MARILLAS	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Matthieu	MEYER	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
Mme	Darrène	NGUYEN	Sciences biologiques	57-03
Mme	Virginie	PANNEREC	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
Mme	Chloé	PELOURDE	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme	Candice	PEYRAUD	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Jean-Philippe	PIA	Prothèse dentaire	58-02
M.	Mathieu	PITZ	Parodontologie	57-01
M.	Clément	RIVES	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	François	VIGOUROUX	Parodontologie	57-01

Remerciements

A notre Présidente de thèse

Madame le Professeur Véronique DUPUIS

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section Prothèse dentaire 58-02

Merci d'avoir accepté de siéger à cette thèse.
Je suis honorée de pouvoir soumettre ce travail à votre jugement.

A notre Directeur de thèse

Madame le Docteur Cécile BADET

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section Sciences biologiques 57-03

Je vous remercie pour votre accueil au laboratoire et de m'avoir fait confiance pour traiter ce sujet. Vous m'avez fait découvrir le monde passionnant de la recherche qui, outre des bases scientifiques, nécessite une enrichissante remise en question permanente et de la patience. Votre disponibilité, votre gentillesse et vos encouragements ont été précieux tout au long de la réalisation de cette thèse.
C'est un plaisir de vous avoir eu comme enseignante durant mon cursus universitaire.

A notre Rapporteur de thèse

Madame le Docteur Javotte Nancy

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section Odontologie pédiatrique 56-01

Votre enthousiasme, votre bienveillance, votre envie de transmettre et votre capacité à toujours trouver une solution ont accompagné mes vacations hospitalières et l'évolution de ma thèse. Merci pour votre accueil dans le service d'odontologie de L'Hôpital Saint André et le bloc opératoire de l'Hôpital des enfants pour mes prélèvements.

A notre Assesseur

Madame le Docteur Darrène N-GUYEN

Assistante Hospitalo-Universitaire

Sous-section Sciences biologiques 57-03

C'est un honneur de vous compter dans mon jury. Ces heures communes au laboratoire ont été un plaisir. Merci pour votre contribution.

A Martine Saint-Marc

Je te remercie pour ton encadrement, ton assistance indispensable, ta patience et ta gentillesse. Ces nombreuses heures partagées au laboratoire ont toujours été très agréables.

A mes parents, mes frères, ma famille

Qui ont toujours été d'un soutien sans faille. Leur présence, leur écoute, leurs conseils avisés et leur tendresse sont une grande force. Des remerciements sans cesse renouvelés et une immense gratitude pour tout ce que vous m'apportez.

A mes amis,

Qui me sont indispensables. Leur joie de vivre, leur générosité, leur confiance et leur présence dans toutes les situations enchantent ma vie.

Aux Dr Claude ANGEL, Dr Renaud THAURY, Dr Véronique KUCHENBUCH-DUMARTIN

En vous remerciant pour votre accueil, votre accompagnement bienveillant et votre confiance lors de mes débuts dans la vie professionnelle.

Table des matières

Remerciements : 5

Introduction : 10

Rappels Bibliographiques 11

I. La Carie Précoce de l'Enfance 12

A. Tableau clinique : 12

1. Localisation spécifique : 12

2. Evolution : 12

3. Conséquences 12

B. Etiologie : maladie infectieuse multifactorielle : 13

1. Facteurs microbiens : 14

2. Facteurs liés à l'hôte : 14

3. Les facteurs liés à la famille 15

4. Facteurs liés à l'environnement: 16

C. Prévention : 17

1. Prévention primaire : 17

2. Prévention secondaire : 18

3. Prévention tertiaire : 18

II. *Streptococcus mutans* et *Scardovia wiggsiae* : 19

A. Streptococcus mutans 19

B. Scardovia wiggsiae 19

Travaux Expérimentaux 21

I. Matériel et méthodes 22

A. Population étudiée : 22

B. Prélèvement – Mise en culture : 22

C. Identification 23

1. Observation des colonies : 23

2. Identification biochimique : Galerie Rapid 32A BioMérieux 23

3. Identification moléculaire : 23

II. Résultats : 25

A. Description de la population : 25

B. Identifications bactériennes : 27

1. Culture de la souche ATCC *Scardovia wiggsiae* : 28

2. Galerie Rapid ID 32 A : 29
3. PCR 30
III. Discussion : 31
Conclusion : 34
ANNEXES : 35
A. ANNEXE 1 : Document d'information et Consentement éclairé 36
B. Annexe 2 : Questionnaire 38
C. Annexe 3 : Solution de Ringer PRAS (pré-réduit stérilisée de manière anaérobie) 39
D. Annexe 4 : Gélose acide 39
E. Annexe 5 : Gélose Mitis 39
F. Annexe 6 : PYG 40
Bibliographie 41

Introduction :

L'atteinte carieuse est un problème de santé publique qui affecte de plus en plus d'enfants, , dans le monde entier.(1,2) En particulier, la carie précoce est responsable de la destruction de la denture temporaire avec de nombreuses retombées sur la santé de l'enfant. Elle peut, par exemple, impacter l'évolution de la denture définitive et augmenter la probabilité de développer de nouvelles lésions carieuses sur cette dernière. Afin de pouvoir mettre en place des mesures de prévention, il a donc été nécessaire d'en déterminer les facteurs de risques, et les mécanismes éthiopathogènes dont, notamment, les acteurs bactériens.

Les premières dénominations associées au phénomène carieux chez le jeune enfant ont été en rapport soit avec une étiologie, comme « carie du biberon », « baby bottle tooth decay » « nursing caries » (3), soit avec un tableau clinique tel que « caries rampantes » « maxillary anterior caries » (4)

En 1994, la conférence de consensus des Centers for Disease Control and Prevention, adopte un nouveau terme basé sur le jeune âge des patients : « Early Childhood Caries » (ECC), en français « Carie Précoce de l'Enfance » (CPE). (5) Pour l'American Association of Pediatric Dentistry, tout enfant de moins de 6 ans ayant et/ou ayant eu une lésion carieuse (ou plus) sur sa denture temporaire est atteint d'ECC (dent cariée, obturée ou absente pour cause de carie).(3) Le National Institute of Health, plus précis, situe l'ECC entre 0 et 71 mois.(6)

L'ECC sévère (S-ECC) est aussi définie en fonction de l'âge de survenue et du degréd'atteinte. Ainsi la S-ECC concerne l'enfant de moins de 3 ans avec une atteinte carieuse de surface(s) dentaire(s) lisse(s), l'enfant de 3 à 5 ans ayant des lésions en rapport avec les surfaces lisses des dents antérieures maxillaires ou un CAOF supérieur ou égal à 4 à 3 ans, à 5 à 4 ans, à 6 à 5 ans.

D'après l'étude de A.Tanner (2011), les bactéries identifiées comme étant associées à l'ECC sont principalement les *Streptococcus mutans*, *Scardovia wiggsiae Veillonella parvula* et *Actinomyces gerensceriae* (7). *Scardovia wiggsiae,* un bacille Gram+, a été identifié par l'équipe de cette chercheuse comme intervenant dans l'évolution de la carie précoce de l'enfant. Toutefois aucune étude sur la présence de cette bactérie n'a été menée au sein d'une population d'enfants français souffrant de caries précoces.

L'objectif de ce travail est donc de rechercher la présence de *Scardovia wiggsiae* dans un échantillon de 25 enfants atteints de caries précoces, venant en consultation dans le service d'Odontologie Pédiatrique du CHU de Bordeaux, afin de corroborer l'association de cette espèce à cette pathologie.

Rappels Bibliographiques

I. La Carie Précoce de l'Enfance

A. Tableau clinique :

Il est obtenu par examen clinique et radiologique.

1. Localisation spécifique :

Elle dépend de la chronologie d'éruption des dents, de leur durée d'exposition aux facteurs de risques et des caractéristiques des mouvements musculaires de succion de l'enfant.(5) L'attaque carieuse affecte donc en premier les faces vestibulaires des incisives maxillaires, puis celles des molaires maxillaires, les faces palatines des canines maxillaires suivies des faces linguales des molaires mandibulaires et pour finir, les incisives mandibulaires. Ces dernières sont moins atteintes car elles bénéficient de l'action nettoyante de la langue pendant la succion ainsi que des effets tampon et de clairance de la salive émise à proximité par les glandes salivaires sous-maxillaires et sublinguales. (5,8)

2. Evolution :

Sans traitement, quatre stades d'évolution sont décrits : le *stade initial* avec des lésions blanc crayeux réversibles mais rarement détectées par les parents; le *stade 2* avec atteinte dentinaire (dentine molle et jaune visible, sensibilité au froid exacerbée); le *stade 3* avec atteintes dentino-pulpaires (douleurs provoquées à la mastication et au brossage, douleurs spontanées la nuit) et enfin *le stade 4* avec fracture coronaire accompagnée de douleurs continues affectant, entre autres, l'alimentation et le sommeil de l'enfant. (5, 9, 10)

3. Conséquences (11)

a) Conséquences bucco-dentaires :

La progression de la lésion carieuse provoque une destruction de l'organe dentaire avec, à terme, une nécrose du tissu pulpaire puis des atteintes pulpo-parodontales aiguës (cellulite avec adénopathie, mobilité de la dent causale) ou chroniques (les plus fréquentes, avec formation de parulies). Les germes des dents définitives peuvent être atteints si l'infection se propage. (5,10) De plus, il a été observé qu'un enfant atteint de CPE est plus susceptible de développer des lésions carieuses sur ses dents définitives. (8,12)

b) Conséquences fonctionnelles :

La perte de l'organe dentaire peut empêcher une acquisition adéquate des praxies orales par mauvaise position de la langue (5) et, également, un développement harmonieux des maxillaires. (13)

c) Conséquences psychologiques :

Les dommages esthétiques (dents noires ou absentes, défaut de croissance des maxillaires) et les difficultés de prononciation affectent l'entrée de l'enfant dans la vie sociale. Le manque de sommeil et la douleur en font un enfant irritable, ayant des troubles de la concentration et des absences scolaires répétées (14) (15) (16)

d) Conséquences générales :

Les difficultés à s'alimenter et le manque de sommeil impactent négativement la croissance de l'enfant (taille et poids inférieurs à la moyenne) (8) (17,18) (19). De plus, des maladies comme le diabète et l'endocardite infectieuse peuvent résulter de la bactériémie. (20)

B. Etiologie : maladie infectieuse multifactorielle(21) :

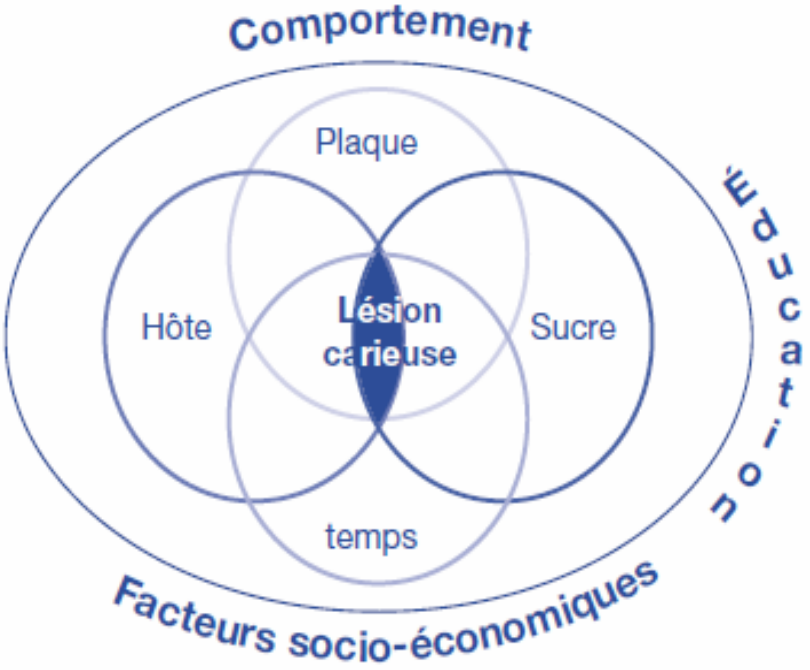


Figure 1. Schéma de KEYES modifié par Newbrun revu par Reinse et Douglas. (22)

1. Facteurs microbiens :

Les apports répétés de sucre amènent au déséquilibre de l'écosystème buccal par développement préférentiel de certaines espèces bactériennes. L'équipe d'A.Tanner a étudié la flore bactérienne associée à la CPE et met en avant les principaux protagonistes. *Streptococcus mutans* est une espèce initiatrice du phénomène carieux et donc la plus étudiée. *Scardovia wiggsiae* est l'objet de notre étude et sera décrite ultérieurement. *Veillonella parvula*, bactérie gram négatif, n'est pas acidogène mais participe à la croissance des espèces cariogènes (notamment *S.mutans*) dans le biofilm bactérien. Les bactéries du genre *Actinomyces* sont des envahisseurs secondaires. Des bifidobactéries (dont *Bifidobacterium dentium*) et des lactobacilles ont également été détectés. (7)

2. Facteurs liés à l'hôte :

a) L'âge :

Certaines caractéristiques anatomiques et physiologiques de la dent temporaire la rendent plus susceptible à la déminéralisation. Les tissus qui la composent sont plus fins et moins minéralisés que ceux d'une dent définitive. L'émail étant immature, la cario-susceptibilité est maximale jusqu'à un an après l'éruption de la dent (36). La forme coronaire globuleuse et les sillons marqués des molaires favorisent la rétention de plaque. La largeur des tubuli dentinaires et la chambre pulpaire volumineuse permettent une progression plus rapide de la lésion carieuse.

b) Spécifiques à l'individu :

Les bébés de petit poids à la naissance mangent peu mais plus fréquemment, augmentant ainsi le risque de développer des CPE (9).

Des carences alimentaires (la malnutrition et/ou au refus de s'alimenter en raison de douleurs dentaires) influeraient négativement sur la formation de l'organe dentaire (impliquant des défauts de structure) et les mécanismes de défense (qualité et quantité de la salive, production de cellules immunocompétentes) (9).

Un état de santé fragile, une pathologie chronique, impliquent la prise fréquente de médicaments pouvant contenir des sucres et, quelquefois un comportement plus permissif des parents face à la nourriture et à l'hygiène bucco-dentaire. Par ailleurs, certains handicaps rendent le maintien de l'hygiène bucco-dentaire difficile.

La salive joue un rôle essentiel dans la protection de la carie. Elle aide à l'élimination des débris alimentaires vers le tube digestif permet un effet tampon neutralisant les acides (37), une action antibactérienne par certains facteurs de défense dont des protéines antibactériennes (9) et une reminéralisation par les ions phosphate et calcium qu'elle contient. Toute xérostomie ou défaut de production augmentent donc le risque de CPE (respirateur buccal, hyposialie d'origine médicamenteuse, maladies…) (38). Le débit salivaire se trouvant réduit durant le sommeil, le jeune enfant (0 à 2 ans) est d'autant plus exposé qu'il dort en moyenne 15 heures par jour.

Au niveau de l'organe dentaire, des antécédents de lésions carieuses (21), des restaurations, des anomalies de structure de l'émail et/ou de la dentine (MIH, hypoplasie, fluorose…) ou une morphologie anfractueuse des sillons sont des facteurs prédisposant à de futures lésions carieuses (3, 9, 21, 38).

3. Les facteurs liés à la famille

Ils peuvent être génétiques, biologiques (flore bactérienne) mais aussi liés au comportement de la famille au niveau hygiène alimentaire (nature et fréquence de l'alimentation) (2) et hygiène bucco-dentaire (brossage, visites régulières chez le chirurgien-dentiste).

a) Alimentation

Chez le jeune enfant, l'allaitement est encouragé car bénéfique sous bien des aspects (38). Cependant, il est conseillé par l'OMS et le Plan National Nutrition Santé (www.mangerbouger.fr/**pnns** édité par le Ministère de la Santé) de diversifier l'alimentation progressivement à partir de 6 mois, un allaitement partiel étant possible jusqu'à 2 ans aux horaires des repas seulement. (3,5). Plus tard, la composition des aliments du régime nutritionnel de l'enfant et leur capacité à rester en bouche, de par leur consistance, est à considérer (5, 38). Ainsi tout aliment contenant des glucides fermentescibles par les bactéries cariogènes ou ayant un potentiel érosif élevé (pH bas) peut être considéré comme cariogène. Il faut privilégier une alimentation provocant une mastication active qui augmente la production de salive et décolle une partie des aliments rémanents (5).

Plus important que la quantité de sucres consommée, la fréquence des prises alimentaires est un facteur capital dans la survenue de la lésion carieuse (3, 36, 39, 40). En effet, chaque prise de produits potentiellement cariogènes (aliments et/ou boissons) entraine une baisse du pH buccal qui, s'il est inférieur à 5,5, est responsable d'une déminéralisation irréversible des surfaces dentaires. Si les prises alimentaires sont trop rapprochées dans le temps, la zone de pH stable et de reminéralisation n'est jamais retrouvée. (21, 38). Cinq prises maximum de produits sucrés par jour sont conseillées par l'OMS (28, 41).

Ainsi ce n'est pas tant le pouvoir cariogène du lait mais sa consommation à la demande et prolongée dans le temps qui en font un produit souvent à l'origine d'une atteinte carieuse précoce. (3, 8, 38, 40, 42).

Enfin toute alimentation cariogène nocturne est à éviter car la production salivaire protectrice est réduite et le contact dents/tétine du biberon ou de la sucette recouverte d'un produit sucré est prolongé (5). Seule la prise d'eau est autorisée (5, 8, 9).

b) Hygiène bucco-dentaire

Les surfaces dentaires atteintes en premier (faces vestibulaires des incisives maxillaires) sont aussi celles qui sont les plus accessibles au brossage. Dans le cadre de la CPE, cela implique une hygiène dentaire défaillante (9). Le brossage doit avoir lieu dès l'éruption de la première dent (43), deux fois par jour (le soir étant le plus important en raison de la diminution du débit salivaire au cours de la nuit) avec un dentifrice fluoré et une brosse à dents souple adaptée à l'âge de l'enfant (44). L'implication des parents pour un brossage efficace évolue avec l'âge : au début réalisé par eux, il sera, par la suite, supervisé puis seulement contrôlé. (45)

c) Fluor

Le tissu dentaire minéralisé subit une alternance déminéralisation/reminéralisation due aux variations de pH dans la cavité buccale. Les ions fluor participent à la minéralisation de l'organe dentaire. En effet, en s'alliant à l'hydroxyapatite, ils stabilisent les cristallites et donc renforcent l'émail face aux attaques acides. De plus, les fluorures ont une action inhibitrice sur les bactéries. Leur absorption par ces dernières se trouve augmentée par un milieu extracellulaire acide (44).

Il existe de nombreux modes d'apport de fluor : dans l'alimentation (sel enrichi en fluor, eau, lait), les produits d'hygiène bucco-dentaire (dentifrices et bains de bouche) (28) et les produits de supplémentation en cas de risque carieux élevé (gouttes, comprimés, gels, vernis) (37) .

Il convient de réaliser un bilan personnalisé de l'enfant en fonction de son âge et de son risque carieux afin d'évaluer ses besoins en fluorothérapie et d'éviter tout surdosage.

4. Facteurs liés à l'environnement (2):

Les enfants issus d'un milieu socio-économique défavorisé sont plus atteints par la maladie carieuse (36, 37, 42). Cela peut s'expliquer par une alimentation déséquilibrée, avec consommation de produits industriels très caloriques pour une faible portion , des difficultés à

acquérir et à renouveler le matériel adéquat pour l'hygiène bucco-dentaire et des horaires de travail ne permettant pas d'être présent pour superviser le brossage de l'enfant. (5).

Pour contrebalancer une situation de vie difficile, les parents ont aussi tendance à gâter leurs enfants.

De même, un faible niveau d'éducation des responsables de l'enfant se trouve lié à une forte prévalence de la CPE. (5, 9). Des comportements à risques, la peur du fauteuil dentaire et une visite tardive chez le chirurgien-dentiste sont souvent corrélés à un manque de connaissances en terme d'hygiène alimentaire (danger de l'allaitement à la demande et prolongé, nature cariogène du régime alimentaire, fréquence des prises alimentaires), d'hygiène bucco-dentaire (brossage dès la première dent, deux fois par jour (3)) et du caractère infectieux de la maladie carieuse. (9).

Le recours tardif aux soins et le manque d'impact des campagnes de prévention tiennent aussi à une vision de la santé plutôt négative voir fataliste (5). Dans les milieux défavorisés, le renoncement aux soins chez l'enfant est doublé par rapport au reste de la population (28).

La complexité d'une situation familiale (famille monoparentale suite à une séparation) ou la démission parentale dans l'éducation de l'enfant peuvent également être à l'origine d'attitudes à risque cariogène pour apaiser ce dernier, voire de négligences. Enfin le stress généré au quotidien par une instabilité financière, sociale, familiale (…) jouerait un rôle sur les facteurs immunologiques et représenterait donc un facteur de risque de la CPE. (5,9).

Parfois, les soins sur enfants sont redoutés (relationnel, compétences techniques particulières) par les praticiens libéraux qui adressent aux services hospitaliers (submergés, éloignés) ou aux rares pédodontistes (28). L'approche du praticien dépendra de l'étendue de l'ECC et du niveau de compréhension de l'enfant (soins sans sédation, sous MEOPA, sous anesthésie générale) (42).

C. Prévention :

1. Prévention primaire :

La prévention primaire permet l'éducation de l'entourage de l'enfant à l'hygiène alimentaire et bucco-dentaire, à l'utilisation du fluor et aux modes de transmission des bactéries cariogènes (36). Cet apport d'information recommandé par l'HAS (2010) peut débuter chez la femme ayant un projet d'enfant (43), se poursuivre chez la femme enceinte et la jeune mère, les habitudes de santé étant transmises principalement par la mère (28). Ainsi, aux Etats Unis, un programme a permis le suivi de la mère dès le 4^{ième} mois de grossesse puis celui de l'enfant jusqu'à 3.5 ans. Il a entrainé un nombre accru d'enfants indemnes de caries (46). Afin de prévenir la

transmission verticale, il convient de supprimer les réservoirs de *Streptococcus mutans* (hygiène, soins lésions carieuses) chez la mère (3, 47).

Toutefois, ces recommandations auprès des parents ne se révèlent efficaces qu'à court terme, lorsqu'elles sont suivies, (1) et sont donc à réévaluer et à renouveler lors de visites régulières chez le praticien (28).

Des rendez-vous répétés du jeune enfant chez le dentiste permettent aussi de le familiariser avec l'environnement et les comportements au cabinet dentaire. Parmi les actes réalisés, on peut citer l'application de vernis fluoré chez les enfants à risque de CPE (48) ou le scellement de sillons permettant de réduire les zones anfractueuses rétentrices de plaque.

2. Prévention secondaire :

Le dépistage et les soins, réalisés le plus tôt possible, constituent la prévention secondaire. Pour cela, une visite entre 6 mois et un an est recommandée par l'Association Dentaire Américaine, l'Académie Américaine de Dentisterie Pédiatrique et l'Association des Dentistes de Santé Publique, mais elle est peu réalisée en général, les familles n'ayant pas conscience de l'importance d'une consultation précoce. Les pédiatres peuvent être sensibilisés à la détection de ces lésions et rediriger précocement le jeune enfant vers le chirurgien-dentiste (43).
La prise en charge des CPE est lourde car elle implique des soins multiples chez des enfants en bas âge et une contamination intersites. L'anesthésie générale peut être une solution à ces différents paramètres mais les délais sont souvent importants (4 à 6 mois) en raison du manque de structures. (28)

3. Prévention tertiaire :

La prévention tertiaire permet de rétablir les fonctions, l'esthétique et de conserver l'espace jusqu'à l'éruption des dents définitives. Elle implique la réalisation et la mise en place de prothèses et mainteneurs d'espace. (36)

II. *Streptococcus mutans* et *Scardovia wiggsiae* :

A. *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans est un cocci gram + aéro-anérobie facultatif impliqué dans l'initiation et la progression de la carie dentaire. En effet, il synthétise des polysaccharides extracellulaires permettant son adhérence aux surfaces dentaires. De plus, il produit des acides en dégradant les polysaccharides amenés par l'alimentation ou ceux stockés au niveau intracellulaires. Enfin, il peut évoluer dans des environnements acides (8, 23, 24). La contagion précoce d'un enfant par *Streptococcus mutans* augmente le risque de développer des lésions carieuses (21) (25). Chez les enfants atteints d'ECC, il constitue plus de 30% des bactéries cultivables de la plaque contre 0.1% chez les sujets indemnes de caries (1).

L'éruption des incisives mandibulaires et des molaires maxillaires (anfractueuses donc plus susceptibles de retenir la plaque dentaire) est une période critique car elle constitue une fenêtre d'infectiosité caractérisée par une contamination accrue (26–28).
Il peut y avoir une *« contagion verticale »*, c'est-à-dire de la mère à l'enfant (29) et/ou une *« contagion horizontale »* au sein d'un groupe (fratrie, crèches) par la salive (tester la nourriture avec la même cuillère que l'enfant, partage de brosse à dents, jouets….). (30)

B. *Scardovia wiggsiae*

Le développement bactérien dû à un régime riche en sucre, à l'absence d'hygiène et à l'apparition de cavités carieuses entraine l'épaississement de la plaque dentaire et donc l'apparition d'une flore anaérobie dans les zones privées d'oxygène. Ainsi *Scardovia wiggsiae* a été détectée au sein d'échantillons de biofilm dentaire chez des enfants souffrant de caries précoces, associée, ou non, à *Streptococcus mutans* (7, 12, 31). Les auteurs ont émis l'hypothèse que *Scardovia wiggsiae* était soit un initiateur de la lésion carieuse, soit un envahisseur secondaire de cette lésion progressant dans la dentine (7). Son implication dans la progression des caries dentinaires profondes est confirmée par sa présence dans les pulpes infectées d'enfants.(32) Cependant, cette espèce a également été mise en évidence dans les lésions blanches amélaires, lésions initiales de l'atteinte carieuse. (31) L'association de *Streptococcus mutans* et *Scardovia wiggsiae* est un facteur de risque pour l'ECC. Ainsi, dans l'étude de Tanner et al. (7), il est constaté, que 80% des enfants présentant l'association de ces deux espèces de bactéries sont atteints d'une ECC sévère.
Le nom de *Scardovia wiggsiae* fait référence à un microbiologiste italien Vitorrio Scardovi (travaux sur les bifidobactéries) (33) et à un microbiologiste américain nommé Loïs Wiggs (travaux sur la microbiologie anaérobie). (34)

Cette bactérie a été isolée à partir de prélèvements issus de la cavité buccale (lésions carieuses (34), tissu de carcinome épidermoïde oral) (35) et d'une blessure infectée sur le bras d'un consommateur de drogue en intraveineuse (34). C'est un bacille gram+, anaérobie, non mobile, non-sporulé (34), acidogène et acido-tolérant (7). Ce bacille mesure 1.6 à 0.7µm sur 1.6 à 4 µm. Il adopte des formes diverses (droit, courbé, en forme de club de golf) et se trouve seul, en paire ou en courtes chaines avec des ramifications et des arrangements communs aux bacilles diphtériques.(34) Les colonies, convexes sur gélose Fastidious Anaerobe Agar (après 7 jours d'incubation), mesurent entre 0.4 et 1.2 mm de diamètre et ont des morphologies diverses (circulaires, irrégulières voire en forme de molaire). Elles prennent des teintes opaques grises, blanc cassé ou crème. Si on augmente le temps d'incubation, elles deviennent plus irrégulières avec une surface ridée et cireuse et une coloration jaune-orangée dans les zones de forte densité. La dénomination de la souche type est C1A-55^T (=DSM 22547^T=CCUG 58090^T). *Scardovia wiggsiae* est le taxon oral humain 195 dans la base de données du microbiome oral humain (34)

Fermentation:	D-arabinose, fructose, galactose, glucose, maltose, raffinose, ribose, sucrose sans production de gaz,
	faible du mannose
	variable de lactose, melibiose et salicin
Ne fermente pas:	cellobiose, dextran, ,mannitol, melezitose, rhamnose, sorbitol, trehalose ou xylose
Dans bouillon PYG:	production importante d'acide acétique, faible à moyenne d'acide lactique
Hydrolyse:	saccharose
Hydrolyse variable:	esculine
Pas d'hydrolyse:	L-arginine, gélatine, urée
Pas de production:	d'indole, catalase, H2S
Pas de réduction :	nitrate

Tableau 1 : Description biochimique de *Scardovia wiggsiae* (34)

Travaux Expérimentaux

Objectif :

Le but de ce travail est de rechercher sur des prélèvements de tissus carieux d'enfants atteints de caries précoces la présence de *Scardovia wiggsiae.*

I. Matériel et méthodes

A. Population étudiée :

L'étude cible des enfants âgés de 24 à 71 mois qui ont été vus en consultation dans le service d'Odontologie de l'hôpital Saint André (CHU de Bordeaux) du 17 septembre 2014 au 12 décembre 2014. L'étude a été menée sur une population de 25 enfants dont la moyenne d'âge était de 56,28 mois.

Pour être inclus, ils devaient être en bonne santé, c'est-à-dire ne présenter aucune pathologie chronique physique ou psychologique. La prise d'antibiotiques dans les 3 mois précédant le prélèvement était un critère d'exclusion.

Lors de la consultation, le diagnostic de CPE a été posé suite à un examen endobuccal. L'objet de l'étude a été présenté aux responsables de l'enfant et le consentement éclairé recueilli. (Annexe 1). Un questionnaire standardisé a été soumis aux parents, permettant de consigner les caractéristiques de l'enfant (nom, prénom, date de naissance, prise d'antibiotiques) et de définir la présence de facteurs de risque de la CPE (habitudes alimentaires, hygiène bucco-dentaire, présence de plaque). Enfin un examen bucco-dentaire approfondi est pratiqué et le CAO reporté sur le questionnaire. (Annexe 2)

B. Prélèvement – Mise en culture :

Les prélèvements de plaque et de tissu carieux ont été réalisés en bouche, à l'aide d'un excavateur stérile, au niveau des dents présentant des lésions carieuses.
Les échantillons ont été déposés dans un tube à essai contenant du milieu PRAS Ringer (5ml) stérile (Annexe 3) et acheminés dans les plus courts délais au laboratoire de microbiologie de la faculté d'Odontologie de Bordeaux.

Le prélèvement a été dilué à 10^{-2} puis mis en culture sur gélose acide (spécifique des bactéries acido-tolérantes comme *Scardovia wiggsiae*) (Annexe 4), gélose au sang (peu sélective) et gélose Mitis Salivarius (sélective pour *Streptococcus mutans*) (Annexe 5). Les géloses ont été placées en anaérobiose dans une étuve à 37°C pendant 6 à 7 jours . La durée d'incubation a été déterminée avec la souche ATCC : des colonies sont visibles et dénombrables au bout d'une semaine.

C. Identification

1. Observation des colonies :

Les différentes colonies ont été identifiées, décrites (taille, couleurs, forme, relief) et dénombrées.
Une coloration de Gram de chaque type de colonie a été réalisée afin d'observer au microscope les bactéries la composant.

N'ont été conservés que les bacilles gram+, bactéries susceptibles d'être des *Scardovia wiggsiae* et les cocci gram+ pouvant être des *Streptococcus mutans*.

Les souches sélectionnées ont ensuite été mises en culture en bouillons :

- PYG (peptone-yeast extract-glucose) (34) (Annexe 6) en ce qui concerne les bacilles Gram+, pour une durée de 6 jours, à 37°C.

- TS (Trypticase soja) pour les cocci Gram+, pour une durée de 2 jours à 37°C

Toutes les cultures sont ensuite congelées (1,2ml de culture et 0,6ml de glycérol) à -80°C en attendant une identification plus précise.

2. Identification biochimique : Galerie Rapid 32A BioMérieux (34)

La méthode API est basée sur la comparaison du profil biochimique de la bactérie à identifier avec des profils types. Pour cela, les souches ont été décongelées, 400µL ont été prélevés et mis en bouillon PYG, à l'étuve (37°) pendant 3jours. 50µL d'échantillon bactérien a été étalé sur géloses au sang qui ont été mises à l'étuve (37°C) en anaérobiose pendant 3jours. La culture obtenue a été prélevée à l'aide d'un écouvillon stérile et mise en suspension dans la solution prévue à cet effet. A l'aide d'une micropipette, 55µL de suspension ont été déposés dans chaque cupule de la galerie. 2 gouttes d'huile de paraffine ont été ajoutées au-dessus du test URE. La galerie a incubé 4h30 en aérobiose à 37°C.
La lecture de la galerie a eu lieu 5min (maximum 10min) après avoir ajouté les différents réactifs.

3. Identification moléculaire :

a) Extraction d'ADN :

L'extraction de l'ADN se fait sur une culture de 3 jours de la souche à identifier (bouillon PYG, à 37°C), en suivant le protocole du fabricant (GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit, Sigma Aldrich). Une migration par électrophorèse sur gel d'agarose a été réalisée afin de vérifier la présence effective d'ADN.

b) PCR (Polymerase Chain reaction):

Les PCR ont été réalisées sur l'ADN extrait avec des amorces spécifiques de *S. wiggsiae* et d'*Actinomyces viscosus* (espèces très proches morphologiquement**)**.

Scardovia wiggsiae (12) **:**

- ✓ Amorce sens (Scar448F): 5'-GTG GAC TTT ATG AAT AAG C-3'
  Amorce anti-sens (Scar 619 R) : 5'-CTA CCG TTA AGC AGT AAG-3'
- ✓ Mélange réactionnel pour 2µL d'ADN :
  Tampon 10X : 5µL
  Amorce Scar448F : 1µL
  Amorce Scar619R: 1µL
  DNTP : 1µL
  Taq Polymérase : 0.25µL
  Eau ultrapure stérile : 40,75µL
- ✓ Programme du thermocycleur : 40 Cycles
  Préchauffage (94°C, 2min), Dénaturation (94°C, 20s), Chauffage (51°C, 20s), Elongation (72°C, 20s).
  Extension finale (72°C, 5min)
- ✓ Électrophorèse sur gel d'agarose : permet de mettre en évidence la présence d'une bande d'ADN.
  La présence d'un témoin positif (souche de collection de *Scardovia wiggsiae*) permet de donner une bande de référence de 172 pb

Actinomyces viscosus **:** (50)

- ✓ Amorce SIA1 5'-CGG CGA TGT CAT GAC CTT
  Amorce SIA2 5'- ATG CGG TAG TTG TCG GTG
- ✓ Mélange réactionnel pour 2µL d'ADN :
  10X : 5µL
  Amorce SIA1 : 1µL
  Amorce SIA2: 1µL
  DNTP : 1µL
  Taq Polymérase : 0,25µL
  Eau ultra pure stérile : 39,75µL

- ✓ Programme AV du thermocycleur : 32 cycles

Dénaturation 15sec à 96°C, hybridation 30sec à 55°C, synthèse 1min à 72°C, retour à 4°C.

- ✓ Électrophorèse sur gel d'agarose : l'identification est considérée comme positive en présence d'une bande d'ADN au niveau de 756pb.

II. Résultats :

A. Description de la population :

Sujet	Age (mois)	Antécédents médicaux	Grignotage	Boissons	Biberons/ Allaitement nocturnes	Aliments sucrés
1	68	RAS	oui	Eau, sirop	non	gâteaux, bonbons
2	69	RAS	oui	Eau, jus de fruit	Jusqu'à 30 mois	bonbons
3	66	AG pour extractions multiples 2012	oui	sirop	non	gâteaux
4	56	AG végétations	oui	Coca cola	non	bonbons
5	38	amélogénèse imparfaite	NC	NC	NC	NC
6	65	RAS	oui	sirop	non	gâteaux
7	71	RAS	oui	Eau	Jusqu'à 3 ans	bonbons
8	47	RAS	oui	Coca cola	non	bonbons
9	68	autisme	oui	Eau,	Jusqu'à 5 ans	gâteaux
10	55	RAS	oui	sodas	non	bonbons
11	43	RAS	oui	Jus de fruit	Jusqu'à 30 mois	bonbons
12	66	RAS	oui	coca	Jusqu'à 30 mois	bonbons
13	59	RAS	Non	Ice tea Jus de fruit	Jusqu'à 2 ans	bonbons
14	66	RAS	Non	Eau, jus d'orange	jus d'orange	bonbons
15	59	RAS	oui	Eau,	non	bonbons
16	27	RAS	oui	Jus de fruit	allaitement	bonbons
17	65	RAS	oui	sodas	non	gâteaux, bonbons
18	54	RAS	oui	NC	NC	NC
19	33	RAS		sirop	non	bonbons
20	55	RAS	oui	sirop	Jusqu'à 19 mois	gâteaux, bonbons
21	37	RAS	oui	Eau, coca	Biberon chocolat	gâteaux, bonbons
22	61	RAS	oui	Limonade, jus	non	gâteaux
23	50	RAS	NC	NC	NC	NC
24	58	RAS	Non	Coca cola	Biberon lait	bonbons
25	71	asthme	Non	sodas	non	bonbons

Tableau 2 : Description des patients. (AG = anesthésie générale ; RAS = rien à signaler, NC= non connu, patients et parents ne parlant pas français)

Identification	Fréquence Brossage/jour	Seul/aidé	CAOD	Présence de plaque
P1	2	aidé	14	oui
P2	1	seul	6	oui
P3	1	aidé	4	oui
P4	0/1	seul	13	oui
P5	NC	NC	8	oui
P6	1	seul	9	oui
P7	2	aidé	7	oui
P8	0/1	seul	9	oui
P9	1	aidé	14	oui
P10	1	seul	19	oui
P11	2	aidé	8	oui
P12	1	seul	6	oui
P13	2	seul	6	oui
P14	1	seul	14	oui
P15	1	aidé	13	oui
P16	2	aidé	11	oui
P17	2	seul	12	oui
P18	1	seul	4	oui
P19	2	aidé	6	oui
P20	1	seul	5	oui
P21	2	aidé	6	oui
P22	1	aidé	7	oui
P23	NC	NC	2	non
P24	2	aidé	9	oui
P25	2	aidé	10	oui

Tableau 3 : Hygiène et examen bucco-dentaire (CAOD : dents cariées, absentes ou obturées suite à une lésion carieuse)

Le CAOD était en moyenne de 9 avec un minimum de 2 et un maximum de 19. Il faut prendre en compte le fait qu'il y a eu un examen clinique sans examen radiologique et donc une sous-estimation du nombre de dents cariées

B. Identifications bactériennes :

Nous avons pu isoler 33 bacilles Gram positif et 24 cocci Gram positif.

Identification	Bacilles gram+	Cocci gram +	Congelé	Identification moléculaire
P1	s6	s10, s12	24/09/2014	n6= actinomyces viscosus
P2	s16		17/10/2014	
P3	s19, s20, s21, s22, s23		23/10/2014	
P4	s24	s27	23/10/2014	
P5		s30, s31	23/10/2014	
P6	s33	s36	04/11/2014	
P7	s32	s35	04/11/2014	
P8				
P9	s34 s38	s37	04/11/2014	
P10	s42	s43	12/11/2014	
P11		s39	12/11/2014	
P12	s40	s41	12/11/2014	
P13	s50	s51	18/11/2014	
P14	s48	s49	18/11/2014	
P15				
P16	s47	s44, s45, s46	18/11/2014	
P17	s56		02/12/2014	
P18	s53, s54, s55		02/12/2014	
P19		s52	02/12/2014	
P20				
P21	s57, s58, s59	s60	08/12/2014	
P22	s63		16/12/2014	
P23	s61, s62	s64, s65	16/12/2014	
P24	s66, s67, s68, s69, s70	s72	19/12/2014	
P25	s71	s73, s74, s75	19/12/2014	
	33 bacilles gram+	24 cocci gram+		

Nous n'avons mis en évidence aucune souche de *Scardovia wiggsiae*.

Un seul bacille Gram positif (s6) a pu être identifié par PCR comme étant *Actinomyces viscosus*.

1. Culture de la souche ATCC *Scardovia wiggsiae* :

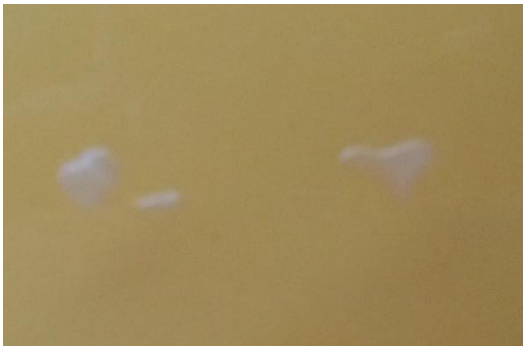


Photo 1 : Colonie sur gélose acide après 7 jours de culture à 37°C



Photo2 : Colonies sur gélose au sang après 7 jours de culture à 37°C

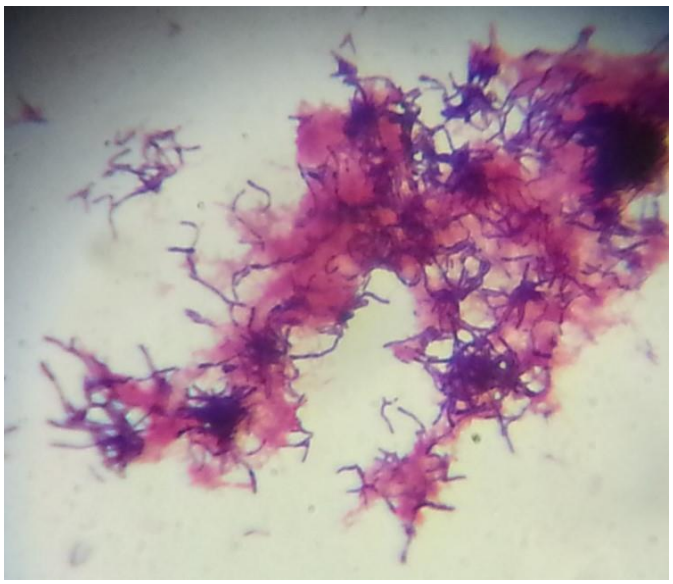


Photo 3 : Observation au microscope de *Scardovia wiggsiae* après coloration de Gram

2. Galerie Rapid ID 32 A :

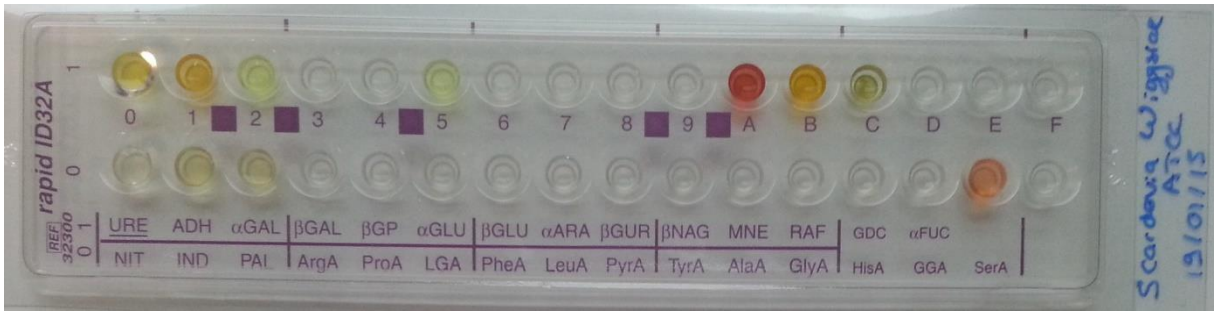


Photo 4 : Galerie Rapid 32A effectuée avec la souche ATCC de *Scardovia wiggsiae*

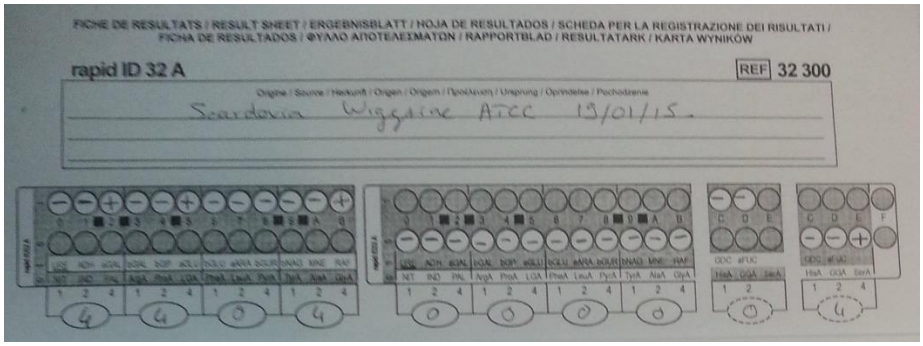


Photo 5 : Profil de la souche ATCC de *Scardovia wiggsiae* déduit de la galerie Rapid 32A.

3. PCR

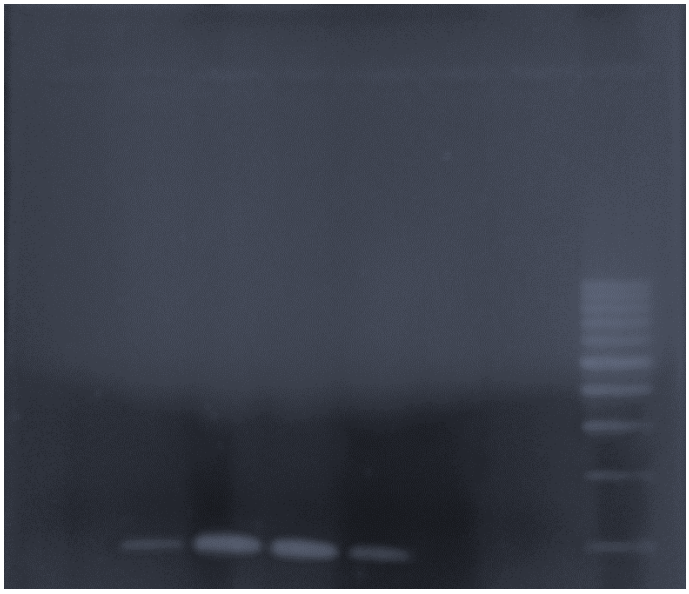


Photo 6 : Gel d'électrophorèse suite à PCR de la souche ATCC de *Scardovia wiggsiae*

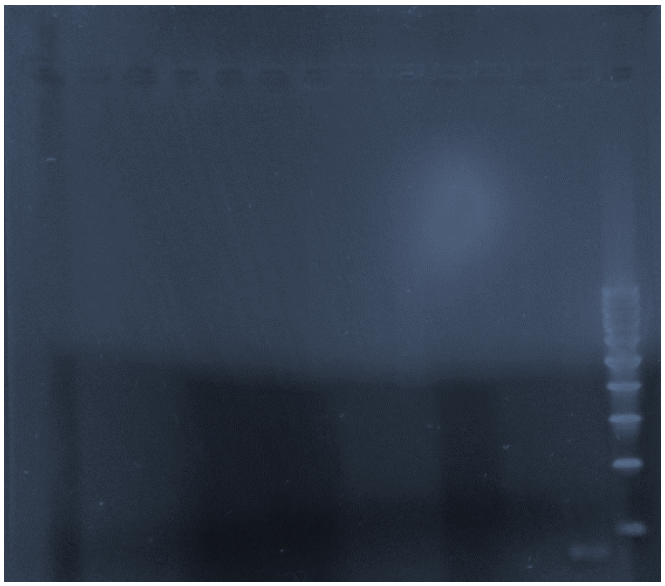


Photo 7 : Gel d'électrophorèse suite aux PCR des souches sauvages s 56, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 66, 67, 68, 69. Seule la bande correspondant à la souche ATCC de *Scardovia wiggsiae* est visible.

III. Discussion :

Nous basant sur les études de Tanner et al, nous avons émis l'hypothèse que *Scardovia wiggsiae* pouvait être présente dans les lésions carieuses cavitaires des enfants atteints de CPE. Cette étude avait pour objectif de connaitre la fréquence d'apparition de cette espèce chez des enfants polycariés soignés dans les services cliniques du CHU de Bordeaux et donc de mettre en évidence le lien entre la présence de la bactérie et la carie précoce de l'enfance. A ce jour, *Scardovia wiggsiae* n'a pas été identifiée dans nos échantillons. Les sujets étaient issus de la patientèle hospitalière qui n'est pas représentative de la population générale (Biais de sélection). Il a été difficile de recruter des sujets n'ayant pas eu de traitement antibiotique les trois derniers mois car une atteinte sévère par la CPE implique souvent des abcès d'origine dentaire et parfois un traitement médicamenteux en urgence.

Les questionnaires ont été remplis avec l'aide des responsables de l'enfant, à l'exception des patients P5, P18 et P23 pour lesquels la communication était limitée, la famille n'étant pas francophone ou anglophone. (Biais d'information)

Les enfants intégrés dans l'étude présentent plusieurs des facteurs de risques de la CPE :

- Ils étaient pour la plupart issus de milieux défavorisés.
- L'hygiène alimentaire était défectueuse, certains cumulant fréquence des repas élevée et alimentation cariogène. 18 enfants pratiquaient le grignotage (5 ne grignotaient pas et 2 non connu), 19 consommaient des boissons cariogènes (3 de l'eau exclusivement et 3 non connu), 16 des aliments cariogènes régulièrement (6 non, 3 non connu), 11 avaient eu ou avaient encore un biberons/allaitement nocturne tardif (11 non, 3 non connu).
- L'hygiène bucco-dentaire était insuffisante. 2 patients se lavaient les dents de manière aléatoire (0 ou1 fois par jour), 11 patients 1 fois par jour (non connu pour 2). Ils étaient assistés par un parent pour 12 d'entre eux (11 le faisaient seul sans vérification et non connu pour 2). Chez les 10 enfants se lavant les dents 2 fois par jour, 8 étaient aidés par un parent. La plaque dentaire était visible chez 24 des enfants (la technique de brossage était donc à revoir, même chez ceux se lavant les dents 2 fois par jour avec accompagnement

.

L'absence de détection de *Scardovia wiggsiae* peut s'expliquer par une véritable absence de la bactérie au sein des prélèvements effectués ou par des faux négatifs dus à des défauts dans les différentes étapes du protocole.

Cependant, afin de pallier la seconde hypothèse, le laboratoire de Microbiologie de la faculté d'Odontologie de Bordeaux a fait l'acquisition de la souche ATCC de *Scardovia wiggsiae* C1A-55^{T}. Cela a permis d'étudier sa morphologie et de valider chaque étape du protocole d'identification. Cette expérimentation est intéressante car elle a permis de produire des photographies jusqu'à présent rares dans la littérature.

Le PRAS Ringer (7) (Annexe 3), milieu de transport choisi, respecte le caractère anaérobie de *Scardovia wiggsiae*.

Ici, nous sommes passés par une étape de culture avant l'identification par PCR (7, 51, 52). Dans d'autres articles, l'extraction d'ADN et l'identification par PCR et/ou séquençage sont réalisées directement sur le prélèvement (31). La PCR seule ne permet de détecter que les espèces recherchées, c'est-à-dire celles dont on possède les amorces. L'étape de culture amène une plus grande diversité dans les bactéries détectées mais certaines ne sont pas cultivables (7). Elle permet d'améliorer la détection de *Scardovia*, entre autres dans les échantillons issus de la dentine cariées profonde (selon l'auteur l'efficacité serait moindre avec les techniques de séquençage en raison d'un manque de spécificité des amorces) (53). La culture implique de ne sélectionner que les bactéries viables, celles présentes vivantes dans le tissu carieux (51). Une fois isolée la souche sauvage vivante peut être conservée. Pour optimiser la détection de *Scardovia wiggsiae*, il conviendrait peut-être d'allier culture/PCR et PCR directe avec les amorces spécifiques. La souche ATCC présentait une culture plus importante sur gélose acide que sur gélose au sang après 7 jours en étuve à 37°C, dans des conditions anaérobies (7,53). On peut supposer que la souche sauvage est plus fragile que l'ATCC et/ou que le temps d'incubation est trop court (8 à 10 jours dans certains articles (7)).

Les cocci gram+ ont été conservés pour être identifiés ultérieurement, l'hypothèse étant que ce sont des *Streptococcus mutans.*

L'identification biochimique par les galeries Rapid32A se base sur l'article de J. Downes de 2011 (34). Elle ne s'est pas révélée efficace. Le tableau d'identification du constructeur ne contenait pas le profil biochimique de *Scardovia wiggsiae*. Il a été obtenu dans la littérature et au laboratoire par un test avec la souche ATCC. Il se trouve que les deux profils divergents. Ainsi dans l'article le profil est 4 4/5 0/1 4 0335 05 alors que nous obtenons avec la souche

ATCC le profil 4404 0000 04. Les profils obtenus avec les échantillons ne se rapprochaient ni du profil décrit par l'article, ni de celui déterminé avec la souche ATCC. Ils n'ont pas non plus permis de rapprocher les prélèvements d'une autre espèce répertoriée dans le tableau de profils du constructeur.

La morphologie d'*Actinomyces viscosus* étant proche de celle de *Scardovia wiggsiae*, des PCR ont été réalisées et ont permis d'identifier l'isolat clinique s6 comme étant un *Actinomyces viscosus.* Les PCR pour identifier *Scardovia wiggsiae* n'ont, en revanche, pas révélé de résultat positif. Il serait intéressant d'utiliser une autre technique que la migration par électrophorèse sur gel d'agarose pour traiter le produit de la PCR. Ainsi, l'article de Lingyang Tian expose une technique d'analyse post-PCR par chromatographie plus rapide et surtout ayant une plus grande sensibilité. Le produit de la PCR, marqué par des particules de latex bleues, migre par capillarité le long de la bande et se trouve piégé par des oligonucléotides complémentaires au niveau de la ligne spécifique à une espèce bactérienne. La présence de la bactérie est donc révélée visuellement par une bande bleue au niveau défini (49).

Dans certaines études (7, 51, 53), le séquençage est utilisé pour déterminer l'identité des souches prélevées. Cette technique pourrait être une solution pour l'identification de nos souches sauvages et validerait ou non les résultats de nos PCR.

A ce jour, une dizaine d'études ont détecté et analysé *Scardovia wiggsiae.* (11, 30, 31, 34, 35, 49, 51–54). Seules trois études (12, 7, 53), toutes menées par TANNER aux Etats-Unis depuis 2011 , la recherchent dans la CPE. De plus, dans les articles sur la flore bactérienne de la CPE parus depuis 2011, la recherche de *Scardovia wiggsiae* n'est pas systématique (23, 55, 56). D'autres études seraient donc à réaliser pour avoir un plus grand recul sur le degré d'implication de cette bactérie dans la CPE et un échantillonnage plus étendu dans diverses régions du Monde.

Conclusion :

Scardovia wiggsiae n'a pas été identifiée parmi les 33 bacilles gram+ recueillis chez les 25 enfants atteints de caries précoces. Le protocole suivi a été validé par la littérature et par l'application de chaque étape sur la souche ATCC en laboratoire. Une autre technique d'identification comme le séquençage pourrait aider à confirmer nos résultats.

Bien que très fortement associée à la Carie Précoce de l'Enfance (12), la détection seule de *Scardovia wiggsiae* n'en fait pas un marqueur fiable de l'activité carieuse contrairement aux lactobacilles. (52)

ANNEXES :

A. ANNEXE 1 : Document d'information et Consentement éclairé

DOCUMENT D'INFORMATION : ETUDE EXPERIMENTALE DE LA PRESENCE DE SCARDOVIA WIGGSIAE DANS LA CARIE PRECOCE DE L'ENFANT.

UFR d'Odontologie de Bordeaux

Personne qui dirige et surveille la recherche : Docteur Cécile BADET

Madame, Monsieur,

Vous avez la possibilité de participer à une étude proposée par Mademoiselle Pauline POIRIER, dans le cadre de sa thèse de Docteur en Chirurgie Dentaire.

La lecture de ce document vous apportera toutes les informations nécessaires en ce qui concerne les différents aspects de cette étude.

Votre participation se fait sur la base du volontariat, et vous avez parfaitement le droit de refuser d'y participer.

But de la recherche

La carie est une maladie infectieuse qui provoque des lésions des tissus durs de la dent.

Des bactéries spécifiques transforment les sucres de l'alimentation en acides qui attaquent l'émail dentaire. En absence de brossage, il y a formation de plaque dentaire qui concentrent des résidus alimentaires, des bactéries et donc des acides au contact de la dent.

Les bactéries à l'origine de la carie sont connues. Récemment une nouvelle bactérie causale a été mise en évidence : *Scardovia wiggsiae*. On cherche donc à la mettre en évidence.

Qui peut participer ?

Les enfants atteints de caries sévères précoces, en bonne santé et n'ayant pas été sous traitement antibiotique depuis 3mois.

Comment va se dérouler le prélèvement ?

En premier lieu, vous devrez répondre à un questionnaire médical, sur les habitudes alimentaires et de brossage de votre enfant.

Puis un examen endo buccal sera réalisé sommairement.

De la plaque et du tissu carieux seront prélevés en passant un instrument au contact de la dent.

Autres informations

Dans le cadre de cette étude, un traitement informatique de vos données personnelles va être mis en œuvre afin de nous permettre d'analyser les résultats.

Ces données seront identifiées à l'aide d'un code, et de vos initiales, de manière à ce que vous conserviez l'anonymat. Toutes les informations obtenues à partir des prélèvements, ou de votre questionnaire médical resteront strictement confidentielles.

Les prélèvements ne seront pas conservés une fois les résultats obtenus.

Vous pouvez vous retirer de l'étude à tout moment, et poser vos questions à Mademoiselle POIRIER, qui se doit d'y répondre.

Avant de procéder au prélèvement, un accord oral vous sera demandé, ainsi que la signature de ce document.

Signature de l'investigateur et du patient

B. Annexe 2 : Questionnaire

NOM :

PRENOM :

AGE :

Traitement antibiotique dans les 3 mois : oui non

Antécédents médicaux et chirurgicaux :

Habitudes alimentaires :

Grignotage :

Boissons :

Biberon sucré nocturne :

Aliments sucrés :

Hygiène :

Fréquence du brossage :

Seul ou aidé :

CAO :

55 54 53 52 51 61 62 63 64 65

85 84 83 82 81 71 72 73 74 75

Présence de plaque :

C. Annexe 3 : Solution de Ringer PRAS (pré-réduit stérilisée de manière anaérobie)

- Solution de Ringer : 50 mL

  (Quantité suffisante pour 1L d'eau distillée)

Chlorure de sodium	9 g
Chlorure de calcium dihydraté	0,25 g
Chlorure de potassium	0,4 g)

- Solution de Résazurine 0,8 mL
- Eau distillée 150 mL
- Métaphosphate de sodium 0,2 g
- Chlorhydrate de L-cystéine 0,1 g

Autoclaver 15 min à 121°C

D. Annexe 4 : Gélose acide

Pour 1L

- TS 20 g
- BHI 26 g
- Yeast extract 10 g
- Hémine 5 mg

  Ajuster le pH à 5,0 avec HCl
- Agar 15 g

E. Annexe 5 : Gélose Mitis

Mélanger 90 g de poudre Difco™ Mitis Salivarius Agar dans 1L d'eau purifiée. Chauffer en remuant régulièrement, laisser bouillir pendant une minute jusqu'à dissolution complète de la poudre. Autoclaver à 121°C pendant 15min. Refroidir à 50-55°C et ajouter 1mL de solution Tellurite de sodium.

F. Annexe 6 : PYG

- Trypticase peptone 5 g
- Peptone 5 g
- Extrait de levure 10 g
- Extrait de bœuf 5 g
- Glucose 5 g
- K_2HPO_4 2 g
- Tween 80 1mL
- Cysteine-HCl×H_2O 0,50g
- Resazurin 1 mg
- Solution saline 40 mL
- Eau distillée 950 mL
- Solution hémine 10 mL
- Solution vitamine K 0,2 mL

Mélanger les composants à l'exception des solutions d'hémine et de cystéine qui seront ajoutées après avoir fait bouillir et refroidir le mélange. A l'aide de NaOH, ajuster le pH à 7,2. Autoclaver.

Solution saline :

- $CaCl_2 \times 2\ H_2O$ 0,25 g
- $MgSO_4 \times 7H_2O$ 0,50 g
- K_2HPO_4 1 g
- KH_2PO_4 1 g
- $NaHCO_3$ 10g
- NaCl 2 g
- Eau distillée 1000 mL

Solution hémine

Dissoudre 50 mg d'hémine dans 1 mL 1N NaOH. Compléter avec de l'eau distillée pour atteindre 100 mL. Conserver au frais.

Solution Vitamine K

Dissoudre 0,1 mL de vitamine K dans 20 mL 95% éthanol. Filtrer, stériliser, conserver au frais à l'abri de la lumière.

Bibliographie

1. Berkowitz RJ. Causes, treatment and prevention of early childhood caries: a microbiologic perspective. J Can Dent Assoc. mai 2003;69(5):304-7.

2. Chaffee BW, Cheng A. Global Research Trends on Early-Life Feeding Practices and Early Childhood Caries: A Systematic Review. J Oral Dis. 19 mai 2014;2014:e675658.

3. American Academy on Pediatric Dentistry, American Academy of Pediatrics. Policy on early childhood caries (ECC): classifications, consequences, and preventive strategies. Pediatr Dent. 2009 2008;30(7 Suppl):40-3.

4. Ismail AI, Sohn W. A systematic review of clinical diagnostic criteria of early childhood caries. J Public Health Dent. 1999;59(3):171-91.

5. Monsarat A. Suivi des taux de Streptococcus ssp et de Lactobacillus ssp chez les enfants atteints de caries précoces avant et après soins sous anesthésie générale. (Thèse d'exercice). (France): Université de Bordeaux 3 oct 2014;91.

6. Brodeur J-M, Galarneau C. L'atteinte de carie est déjà très importante dès l'entrée en maternelle. Journal de l'ordre des dentistes du Québec. avr 2006;3-5.

7. Tanner ACR, Mathney JMJ, Kent RL, Chalmers NI, Hughes CV, Loo CY, et al. Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries. J Clin Microbiol. avr 2011;49(4):1464-74.

8. Kawashita Y, Kitamura M, Saito T. Early Childhood Caries. Int J Dent [Internet]. 2011 [cité 21 juin 2015];2011. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3191784/

9. Fortunel L. La carie de la petite enfance: de la description à la prévention dans les crèches de Bordeaux [Thèse d'exercice]. [France]: Université de Bordeaux II; 2003.

10. Msefer S. Importance du diagnostic précoce de la carie de la petite enfance. Journal de l'ordre des dentistes du Québec. avr 2006;6-8.

11. Casamassimo PS, Thikkurissy S, Edelstein BL, Maiorini E. Beyond the dmft: the human and economic cost of early childhood caries. J Am Dent Assoc 1939. juin 2009;140(6):650-7.

12. Tanner ACR, Kent RL, Holgerson PL, Hughes CV, Loo CY, Kanasi E, et al. Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy. J Dent Res. nov 2011;90(11):1298-305.

13. Losso EM, Tavares MCR, Silva JYB da, Urban C de A. Severe early childhood caries: an integral approach. J Pediatr (Rio J). août 2009;85(4):295-300.

14. Gift HC, Reisine ST, Larach DC. The social impact of dental problems and visits. Am J Public Health. déc 1992;82(12):1663-8.

15. Quinonez R, Santos RG, Wilson S, Cross H. The relationship between child temperament and early childhood caries. Pediatr Dent. févr 2001;23(1):5-10.

16. Blumenshine SL, Vann WF, Gizlice Z, Lee JY. Children's school performance: impact of general and oral health. J Public Health Dent. 2008;68(2):82-7.

17. Acs G, Lodolini G, Kaminsky S, Cisneros GJ. Effect of nursing caries on body weight in a pediatric population. Pediatr Dent. oct 1992;14(5):302-5.

18. Ayhan H, Suskan E, Yildirim S. The effect of nursing or rampant caries on height, body weight and head circumference. J Clin Pediatr Dent. 1996;20(3):209-12.

19. Sheller B, Churchill SS, Williams BJ, Davidson B. Body mass index of children with severe early childhood caries. Pediatr Dent. juin 2009;31(3):216-21.

20. Morrier J-J, Bouvier-Duprez D, Bittar E, Duprez J-P. La carie et ses complications chez l'enfant. EMC Pédiatrie-Maladies infectieuses.1998

21. Badet C. Etude clinique de la carie. EMC. 2011;

22. Gunepin M derache F. impact du xylitol sur le risque carieux - implications militaires. Medécine Armées. 2010;38(4):369-80.

23. Hughes CV, Dahlan M, Papadopolou E, Loo CY, Pradhan NS, Lu SC, et al. Aciduric Microbiota and Mutans Streptococci in Severe and Recurrent Severe Early Childhood Caries. Pediatr Dent. 15 mars 2012;34(2):16E - 23E.

24. Palmer CA, Kent R, Loo CY, Hughes CV, Stutius E, Pradhan N, et al. Diet and caries-associated bacteria in severe early childhood caries. J Dent Res. nov 2010;89(11):1224-9.

25. Köhler B, Andréen I, Jonsson B. The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at 4 years of age. Oral Microbiol Immunol. mars 1988;3(1):14-7.

26. Caufield PW, Li Y, Dasanayake A. Dental caries: an infectious and transmissible disease. Compend Contin Educ Dent Jamesburg NJ 1995. mai 2005;26(5 Suppl 1):10-6.

27. Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. J Dent Res. janv 1993;72(1):37-45.

28. Folliguet M. Prévention de la carie dentaire chez les enfants avant 3ans. mai 2006; Disponible sur: http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Prevention_de_la_carie_dentaire_chez_les_enfants_avant_3_ans.pdf

29. Kowash MB, Pinfield A, Smith J, Curzon ME. Effectiveness on oral health of a long-term health education programme for mothers with young children. Br Dent J. 26 févr 2000;188(4):201-5.

30. Berkowitz RJ. Mutans streptococci: acquisition and transmission. Pediatr Dent. avr 2006;28(2):106-9; discussion 192-8.

31. Tanner ACR, Sonis AL, Lif Holgerson P, Starr JR, Nunez Y, Kressirer CA, et al. White-spot lesions and gingivitis microbiotas in orthodontic patients. J Dent Res. sept 2012;91(9):853-8.

32. Ledezma-Rasillo G, Flores-Reyes H, Gonzalez-Amaro AM, Garrocho-Rangel A, Ruiz-Rodriguez M del S, Pozos-Guillen AJ. Identification of cultivable microorganisms from primary teeth with necrotic pulps. J Clin Pediatr Dent. 2010;34(4):329-33.

33. Jian W, Dong X. Transfer of Bifidobacterium inopinatum and Bifidobacterium denticolens to Scardovia inopinata gen. nov., comb. nov., and Parascardovia denticolens gen. nov., comb. nov., respectively. Int J Syst Evol Microbiol. mai 2002;52(Pt 3):809-12.

34. Downes J, Mantzourani M, Beighton D, Hooper S, Wilson MJ, Nicholson A, et al. Scardovia wiggsiae sp. nov., isolated from the human oral cavity and clinical material, and emended descriptions of the genus Scardovia and Scardovia inopinata. Int J Syst Evol Microbiol. janv 2011;61(Pt 1):25-9.

35. Hooper SJ, Crean SJ, Lewis MAO, Spratt DA, Wade WG, Wilson MJ. Viable Bacteria Present within Oral Squamous Cell Carcinoma Tissue. J Clin Microbiol. 5 janv 2006;44(5):1719-25.

36. Dieng N. Carie de la petite enfance: caractéristiques épidémiologiques et perspectives de prévention (Thèse). 2008; Disponible sur: http://www.sist.sn/gsdl/collect/fmposodonto/index/assoc/HASH0180.dir/42.63.08.21.pdf

37. HAS (Haute Autorité de Santé. Recommandations en santé publique: Stratégies de prévention de la carie dentaire. [Internet]. 2010. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_991245/fr/synthese-strategies-de-prevention-de-la-carie-dentaire

38. Camelot Wangermez D. La carie de la petite enfance de l'étiologie à la prise en charge : importance de la prévention [Thèse d'exercice]. (France). Université de Bordeaux; 2010

39. Badet C, Richard B. Étude clinique de la carie. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Odontologie, 23-010-E-10, 2003, Médecine buccale, 28-260-M-10, 2008

40. Tinanoff N, Palmer CA. Dietary determinants of dental caries and dietary recommendations for preschool children. J Public Health Dent. 2000;60(3):197-206; discussion 207-9.

41. Watt R, Sheiham A. Inequalities in oral health: a review of the evidence and recommendations for action. Br Dent J. 10 juill 1999;187(1):6-12.

42. American Academy of Pediatric Dentistry Council on Clinical Affairs. Policy on early childhood caries (ECC): unique challenges and treatment options. Pediatr Dent. 2006 2005;27(7 Suppl):34-5.

43. Kandelman D, Ouatik N. Prévention de la carie de la petite enfance (CPE). Journal de l'ordre des dentistes du Québec. avr 2006;9-13.

44. Afssaps. Mise au point: Utilisation du fluor dans la prévention de la carie dentaire avant l'âge de 18 ans [Internet]. 2008. Disponible sur:

http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/7db1d82db7f5636b56170f59e844dd3a.pdf

45. Curnow MMT, Pine CM, Burnside G, Nicholson JA, Chesters RK, Huntington E. A randomised controlled trial of the efficacy of supervised toothbrushing in high-caries-risk children. Caries Res. août 2002;36(4):294-300.

46. Günay H, Dmoch-Bockhorn K, Günay Y, Geurtsen W. Effect on caries experience of a long-term preventive program for mothers and children starting during pregnancy. Clin Oral Investig. sept 1998;2(3):137-42.

47. Köhler B, Bratthall D, Krasse B. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium Streptococcus mutans in their infants. Arch Oral Biol. 1983;28(3):225-31.

48. Weyant RJ, Tracy SL, Anselmo TT, Beltrán-Aguilar ED, Donly KJ, Frese WA, et al., American Dental Association Council on Scientific Affairs Expert Panel on Topical Fluoride Caries Preventive Agents. Topical fluoride for caries prevention: executive summary of the updated clinical recommendations and supporting systematic review. J Am Dent Assoc 1939. nov 2013;144(11):1279-91.

49. Tian L, Sato T, Niwa K, Kawase M, Tanner ACR, Takahashi N. Rapid and Sensitive PCR-Dipstick DNA Chromatography for Multiplex Analysis of the Oral Microbiota. BioMed Res Int [Internet].2014. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4251647/

50. Kiyama M, Hiratsuka K, Saito S, Shiroza T, Takiguchi H, Abiko Y. Detection of Actinomyces species using nonradioactive riboprobes coupled with polymerase chain reaction. Biochem Mol Med. août 1996;58(2):151-5.

51. Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. Molecular Analysis of the Microflora Associated with Dental Caries. J Clin Microbiol. juill 2004;42(7):3023-9.

52. Henne K, Rheinberg A, Melzer-Krick B, Conrads G. Aciduric microbial taxa including Scardovia wiggsiae and Bifidobacterium spp. in caries and caries free subjects. Anaerobe. 28 avr 2015;

53. Tanner ACR. Anaerobic culture to detect periodontal and caries pathogens. J Oral Biosci. févr 2015;57(1):18-26.

54. Mantzourani M, Gilbert SC, Sulong HNH, Sheehy EC, Tank S, Fenlon M, et al. The isolation of bifidobacteria from occlusal carious lesions in children and adults. Caries Res. 2009;43(4):308-13.

55. Tao Y, Zhou Y, Ouyang Y, Lin H. Dynamics of oral microbial community profiling during severe early childhood caries development monitored by PCR-DGGE. Arch Oral Biol. sept 2013;58(9):1129-38.

56. Ma C, Chen F, Zhang Y, Sun X, Tong P, Si Y, et al. Comparison of Oral Microbial Profiles between Children with Severe Early Childhood Caries and Caries-Free Children Using the Human Oral Microbe Identification Microarray. PLoS ONE [Internet]. 30 mars 2015;10(3). Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378984/

Vu, Le Président du Jury,

Date, Signature :

Vu, la Directrice de l'UFR des Sciences Odontologiques,

Date, Signature :

Vu, le Président de l'Université de Bordeaux,

Date, Signature :

Pauline POIRIER , Le 20/11/2015

Thèse pour l'obtention du DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR en CHIRURGIE DENTAIRE 2015 – n°74

Discipline : Sciences biologiques-Odontologie pédiatrique

Recherche de *Scardovia Wiggsiae* dans la Carie Précoce de l'Enfance : étude expérimentale.

Résumé

Scardovia wiggsiae a été récemment identifiée parmi les bactéries associées à la carie précoce de l'enfance. L'objectif de ce travail était de rechercher sa présence au sein d'un échantillon de 25 enfants âgés de 27 à 71 mois, atteints de caries précoces, afin de corroborer l'association de cette espèce à cette pathologie. Les prélèvements de tissus carieux ont été mis en culture sur milieux spécifiques. L'identification a été réalisée par méthodes biochimiques (Galerie Rapid 32A) et moléculaires (extraction d'ADN, PCR avec les amorces spécifiques). Aucune souche de *Scardovia wiggsiae* n'a été mise en évidence. Ce résultat peut s'expliquer, soit par une véritable absence de la bactérie au sein des prélèvements effectués, soit par un problème de technique d'identification. Ce dernier point pourrait être amélioré par le séquençage de certaines des souches isolées.

Mots-clés

Dentisterie pédiatrique, *Scardovia wiggsiae*, Carie dentaire, Carie précoce de l'enfance

Search for Scardovia wiggsiae in Early Childhood Caries : experimental study.

Summary

The purpose of this work was to investigate the presence of *Scardovia wiggsiae*, a bacteria associated with the Early Childhood Caries (ECC), in a population of 25 children between 27 to 71 months, affected by ECC, in order to confirm the link between this species and the disease. Carious tissues samples have been cultured on specific medium. Identification was made by both biochemichal (Galerie Rapid 32A) and molecular methods (DNA extraction, PCR with specific primers). No *Scardovia wiggsiae* strain have been found. The explanation could be a real absence of this bacteria in the samples, or the need for further identification methods like sequencing some isolated strains.

Key-words

Pediatric dentistry, *Scardovia wiggsiae*, Dental decay, Early Childhood Caries

Université de Bordeaux – Collège des Sciences de la Santé

UFR des Sciences Odontologiques

16-20 Cours de la Marne

33082 BORDEAUX CEDEX